



日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2001年 6月20日

出願番号

Application Number:

特願2001-225181

[ST.10/C]:

[JP2001-225181]

出願人

Applicant(s):

株式会社ダイナコム

RECEIVED

AUG 08 2002

Technology Center 2100

2002年 7月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

出証番号 出証特2002-3052016

【書類名】 特許願

【整理番号】 DCP2001008

【提出日】 平成13年 6月20日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】

【発明の名称】 オリゴ核酸塩基配列の決定方法とオリゴ核酸アレイ

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市八千代2-4-11 株式会社ダイナコム
内

【氏名】 藤宮 仁

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市八千代2-4-11 株式会社ダイナコム
内

【氏名】 三浦 順一郎

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県茂原市八千代2-4-11 株式会社ダイナコム
内

【氏名】 青木 良晃

【特許出願人】

【識別番号】 597101155

【住所又は居所】 千葉県茂原市八千代2-4-11

【氏名又は名称】 株式会社ダイナコム

【代表者】 藤宮 仁

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 オリゴ核酸塩基配列の決定方法とオリゴ核酸アレイ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 オリゴ核酸塩基配列決定のための基となる複数の核酸塩基配列を記憶するための解析対象核酸塩基配列記憶手段と、その解析対象核酸配列同士を比較し、相互に配列の異なる部分を抽出するための固有部分配列フィルタ手段と、所望の二本鎖結合温度範囲に該当する部分配列を選択するための二本鎖結合温度条件フィルタ手段とを有するオリゴ核酸塩基配列の決定方法であって、求めるオリゴ核酸塩基配列の長さが各解析対象核酸塩基配列毎に可変長であることを特徴とするオリゴ核酸塩基配列の決定方法。

【請求項 2】 前記第 1 項に記載の核酸塩基配列の決定方法であって、求めるオリゴ核酸塩基配列の最小配列長を指定し、それ以上の長さのオリゴ核酸塩基配列を出力する手段を有するオリゴ核酸塩基配列の決定方法。

【請求項 3】 複数のオリゴ核酸を互いに分離した状態で 2 次元状に分布させながら集合実装させたオリゴ核酸アレイであって、二本鎖形成温度が所望の範囲に入るようにオリゴ核酸の長さを可変長にして決定したオリゴ核酸を実装していることを特徴とするオリゴ核酸アレイ。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】 本発明は複数の核酸塩基配列の中から、それぞれ相互に二本鎖を形成しない独立な部分配列配列を決定するオリゴ核酸塩基配列の決定方法に関し、特に所望の二本鎖形成温度範囲となるような可変長のオリゴ核酸塩基配列の決定方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】 遺伝子の発現解析などでは、多数の DNA 断片をガラスなどの基板上に配列させた DNA チップが利用される。DNA チップまたは、DNA アレイと呼ばれるこれらの素子では、数千から数万個の異なる塩基配列情報を持つ DNA や RNA が基板上に載せてある。

【0 0 0 3】

これらの核酸配列は、メッセンジャーRNAから相補的に合成されたDNA、すなわちcDNAや、細胞などから取得したゲノムの断片を基にクローニングされたライブラリなどである。しかし、これらの実際のサンプルではなかなか入手が困難である。そのため、すでに配列情報が読取られたゲノムの配列情報やEST (Expressed Sequence Tag) と呼ばれるメッセンジャーRNAのポリA配列末端側の配列情報を同定した配列情報を用いて、数十塩基長程度のオリゴ核酸塩基配列を決め、それを化学合成して基板に載せる方法が使われるようになってきている。

【0004】

適切なオリゴ核酸塩基配列を決めるに当たっては、部分的に抜き出し目視で配列の相違を見て決定していた。また、近年DNAチップやアレイの集積度が上がり、より多数の核酸断片が集積されるようになってきている。そのために、基板上に配列させるオリゴ核酸塩基配列をすべて決定するためには多くの時間を要していた。

【0005】

また、多数のオリゴ核酸塩基配列を同一基板上にアレイ化するため、それらに求められる二本鎖結合温度条件も加味しなければならず、合成条件として決めた塩基長で固有の配列を持ち、適切な温度条件になる配列を決定するのはかなり困難な作業であった。

【0006】

他の用途であるが、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法 (PCR法) などの遺伝子増幅手段を使用する場合も多数の核酸塩基配列を対象に、固有の塩基配列部分を探してその部分を増幅するための両端側の開始位置に相当する数十塩基長の塩基配列プローブを設計しなければならない。この用途でも同様の該当部位以外での二本鎖結合をしないような固有の配列部分を設計しなければならない。また、二本鎖結合温度に関してもほぼ同じ温度条件である必要がある。

【0007】

設計したプローブは対象となるゲノムや混在する核酸に対して希望の部分だけを増幅するするような固有の配列である必要がある。また、複数の配列対象を同時

に増幅する場合もあり、それらの箇所に関する固有配列条件と、同じ二本鎖結合温度条件を満足する必要がある。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、前述のように、数十個～数万個のアレイ化されたすべてのオリゴ核酸塩基配列において、互いに二本鎖を形成しない固有の配列を持ち、適切な温度で目的の配列との二本鎖結合温度を持つようなオリゴ核酸塩基配列を決定することは、かなり大変な作業であるという問題があった。

【0009】

【課題を解決するための手段】 本発明では上記のような互いに独立で所望の温度範囲で二本鎖を形成するようなオリゴ核酸塩基配列を決定するために、対象となる配列を相互比較し、配列の相違が一定条件以上の部分配列を選択する。また、所望の二本鎖形成温度範囲の条件を与え、それを満足する種々の長さのオリゴ核酸塩基配列を算出する手段を与える。

【0010】

上記手段によれば、オリゴ核酸塩基配列の決定に長さを固定していないため、二本鎖結合温度の条件範囲に適合するオリゴ核酸塩基配列を効率よく選定でき、また、条件を変更した場合でも必要に応じてオリゴ核酸塩基配列の長さを多少変更するだけで、最適なオリゴ核酸塩基配列を求めることができる。

【0011】

【発明の実施の形態】 以下、本発明の一実施例を図に示しながら説明する。図は発明を実施する形態の一例であって、図中、同一の符号を付した部分は同一物を表わしている。

【0012】

図1は、本発明の方法を説明するための全体構成図である。解析の対象となる基の核酸の塩基配列を格納する解析対象核酸塩基配列記憶手段10、さらにその記憶手段10から、核酸塩基配列を読み取り相互に配列を比較しながら固有の部分配列をフィルタする手段11と、二本鎖結合温度条件フィルタ手段12、オリゴ核酸塩基配列決定結果の候補を表示するためのオリゴ核酸塩基配列決定結果表示

手段13から構成される。

【0013】

まず、解析対象核酸塩基配列記憶手段10から読取られた核酸塩基配列情報は、固有部分配列フィルタ手段11に取り込まれて、それぞれ類似性を評価する。類似性は単純文字列比較によって行う。ここで遺伝子配列検索で頻繁に用いられる挿入欠失を加味したホモロジー検索は適していない。あくまでも挿入欠失を想定しないで配列比較を行う。そのためにギャップに対応していない検索手段が適している。

【0014】

米国NCBIのホモロジー検索ツールBLASTを使用する場合はギャップ対応以前のバージョンを用いデータベースサイズに依存して変化する期待値E-valueをかなりゆるく設定し、小さな部分一致でも取出せるようにする。さらに、それらで見つかった断片のスコアを参照し、しきい値で与えたスコア以上のものを類似配列とする。

【0015】

たとえば、解析対象核酸塩基配列の1本を図3に示すように取出す。ひとつの解析対象核酸塩基配列を折り返して複数行にわたって表示してある。また、核酸の塩基情報A、C、G、T(U)はすべてここでは四角形で示してある。さらにBLAST検索で他の解析対象核酸塩基配列に部分一致したものを非固有部分配列として登録していく。同図では黒31で塗りつぶして表示した部分が非固有部分配列を示している。白抜き32は固有部分配列の部分である。

【0016】

BLASTを用いない場合でも、適切な配列幅を決めて、それを窓幅としながら、ずらして比較する文字列一致検索の手法も利用できる。このような方法で、所望のしきい以上で一致する部分一致を検索し、ヒットした結果を一致文字列長を基本とするスコアと一致した位置情報を非固有部分配列として登録する。また必要に応じて繰返し配列部分は非固有部分配列として除かれる。

【0017】

すべての解析対象核酸配列を比較した後で、それぞれの配列に関して得られた類

似性の高い部分を解析対象核酸塩基配列毎に集約する。さらにその類似性の高い部分を消し去った残りの配列部分をフィルタリングされた固有部分配列として出力する。固有部分配列としてフィルタされて得られた結果は、二本鎖結合温度条件フィルタ手段12に送られる。

【0018】

二本鎖結合温度条件フィルタ手段12では、固有部分配列として得られた核酸塩基配列の部分配列から、それらごとに先頭位置を変えながら、指定された二本鎖結合温度条件に入る長さを決定する。二本鎖結合温度の算定方法としてはNearest-Neighbor法 (Santa Lucia, J. Jr. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 1460-1465, 1998) を用いている。結果として各解析対象核酸塩基配列毎に固有の部分配列に対して、先頭位置毎に多数の長さの温度条件に入るオリゴ核酸塩基配列の候補が得られる。

【0019】

図4と図5を用い、解析対象核酸塩基配列のひとつと、それから温度を推定しながらオリゴ核酸塩基配列の候補を取出す手順を説明する。図中解析対象核酸塩基配列のひとつが41の配列である。黒い四角は非固有部分配列を示し、白抜きの四角は固有部分配列を示す。まず取出した解析対象核酸塩基配列の先頭部位から逐次配列を伸ばしながら、二本鎖結合温度を計算する。あらかじめ指定されている温度に入ったら、42に示すようにオリゴ核酸塩基配列の候補として保存する。同様に上限の温度を超える点まで伸張しながら候補として残す。上限に達したら、先頭位置からひとつずらし同様に候補となるオリゴ核酸塩基配列を求める(43)。

【0020】

その部分の処理フローを図5に示す。図5は特定の先頭位置から始まるオリゴ核酸塩基配列で、設定温度範囲に入っている部分を取り出すための処理である。まず、決められた先頭位置からひとつ核酸塩基配列を読み込む(51)。次にその時点までに読み込まれた核酸塩基配列の二本鎖結合温度を計算する(52)。さらにその温度があらかじめ与えられた温度範囲かどうかを判定する(53)。次に

温度範囲に入っている場合は候補として保存する（54）。また、温度に満たない場合は上に戻って、次の塩基配列を取り込む。逆に超えている場合は処理を終了し、次の先頭からの処理に移る。

【0021】

さらに先頭からずらしつつ、黒い四角で示される非固有部分配列部分は飛ばしながら同様の処理を行う。また、部分的に44の例のように末端部分が多少非固有部分配列を含む場合でもハイブリダイゼーション条件を加味すれば、半分程度でも候補として含めて残しても良い。しきい値は候補の数が少ない場合相同性のある程度許すような値に変更して求める必要がある。

【0022】

このようにオリゴ核酸塩基配列の長さを可変にして候補を決定することにより、二本鎖結合温度条件がより狭い範囲でも柔軟に対応したオリゴ核酸塩基配列を算出できるようになる。

【0023】

このようにして得られたオリゴ核酸塩基配列の候補は、オリゴ核酸塩基配列決定結果表示手段13に送られる。オリゴ核酸塩基配列決定結果表示手段13では、各解析対象核酸塩基配列毎に分類し、この段階で必要があれば、たとえば、オリゴ核酸塩基配列の長さ別にソートしたり、2次構造のとりやすさを評価し、2次構造のとりにくいものを優先的に表示する。

【0024】

なお、固有部分配列が非常に短い場合はスコアの小さい部分一致領域を徐々に対象領域に加えて二本鎖結合温度条件を満たす長さまで伸張し、得られたオリゴ核酸塩基配列の低グレードの候補として表示する。

【0025】

なお、候補として出力するオリゴ核酸塩基配列の長さとしては、10塩基長以上で、150塩基以内が望ましい。また、特定の長さたとえば20以上または30以上などの値をしきい値として与えることにより、対象とする解析対象核酸塩基配列以外のサンプルが含まれている場合のハイブリダイズのノイズを減らすことができる。

【0026】

図2には、本実施例で決定したオリゴ核酸塩基配列を実装したオリゴ核酸アレイの一実施例を示す。本実施例では基板23としてガラスを用いている。また基板23上にポリLリジン22をコートしている。さらにその上にスポット装置を使用して上記オリゴ核酸塩基配列の候補から絞られた配列をそれぞれの区画21に実装した。これらはそれぞれの区画ごとにオリゴ核酸塩基配列の長さがそれぞれ異なっているが、それぞれのスポットが適正な二本鎖結合温度範囲に入っているため、安定に対象となる核酸断片を補足させるオリゴ核酸アレイとして利用することが可能である。

【0027】

本実施例ではガラス基板上にオリゴ核酸塩基配列を実装する例を示したが、基板はガラス以外の樹脂などを利用することも可能である。また、メンブレンにスポットしたアレイや、各オリゴ核酸塩基配列が個別のエリアに存在するように区画化された領域に埋め込まれた2次元状のアレイであれば、同様の効果を得ることが可能である。

【0028】

【発明の効果】 以上、説明したように本発明のオリゴ核酸塩基配列の決定方法によれば、解析対象となる核酸塩基配列毎にオリゴ核酸塩基配列の長さを可変にして候補を決定することにより、より高精度に温度仕様条件に合わせたオリゴ核酸塩基配列の候補を合理的に決定することが可能であるという優れた効果を持つ。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の一実施例を説明するための全体構成図

【図2】

オリゴ核酸アレイの実施例を説明する図

【図3】

解析対象核酸塩基配列の非固有部分配列を登録する方法を説明する図

【図4】

解析対象核酸塩基配列の二本鎖結合温度条件を満たすオリゴ核酸塩基配列の候補
を選択する方法を説明する図

【図 5】

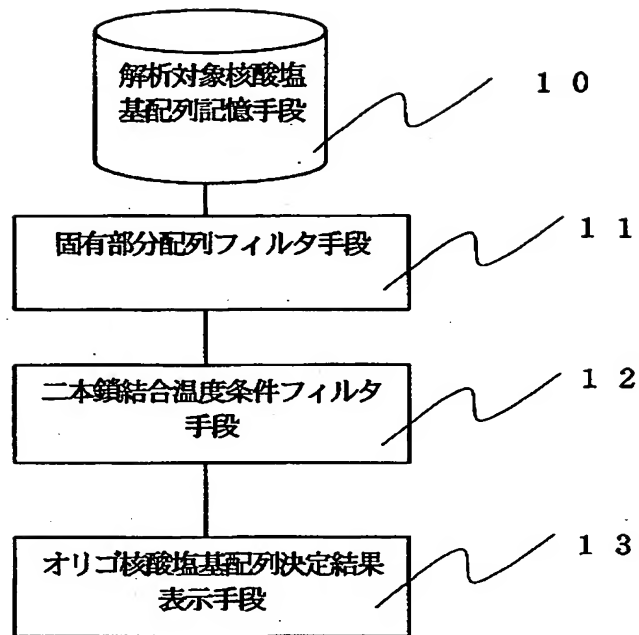
解析対象核酸塩基配列の二本鎖結合温度条件を満たすオリゴ核酸塩基配列の候補
を選択するプログラム処理を説明する図

【符号の説明】

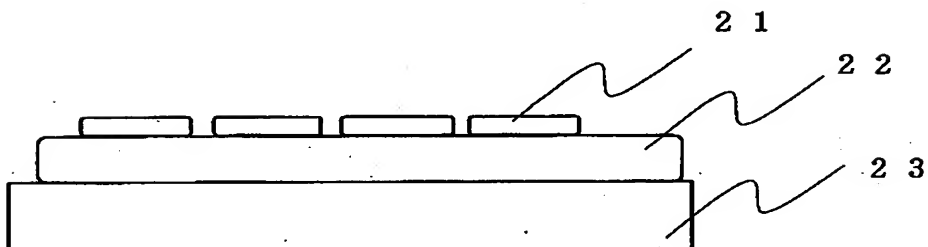
- 1 0 解析対象核酸塩基配列記憶手段
- 1 1 固有部分配列フィルタ手段
- 1 2 二本鎖結合温度条件フィルタ手段
- 1 3 オリゴ核酸塩基配列決定結果表示手段
- 2 1 オリゴ核酸塩基配列のスポット
- 2 2 リジンコート
- 2 3 基板
- 3 1 解析対象核酸塩基配列の非固有部分配列（黒）
- 3 2 解析対象核酸塩基配列の固有部分配列（白）
- 4 1 解析対象核酸塩基配列
- 4 2、4 3、4 4 指定温度範囲のオリゴ核酸塩基配列候補
- 5 1 ~ 5 4 ひとつの先頭位置からのオリゴ核酸塩基配列候補を求める処
理のステップ

【書類名】 図面

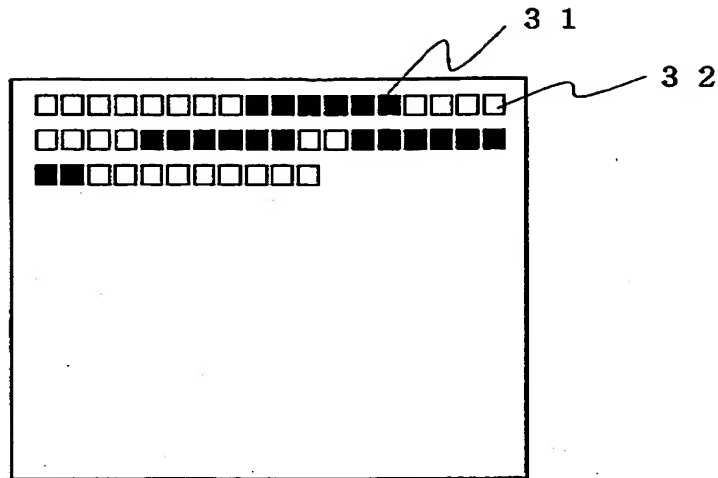
【図 1】



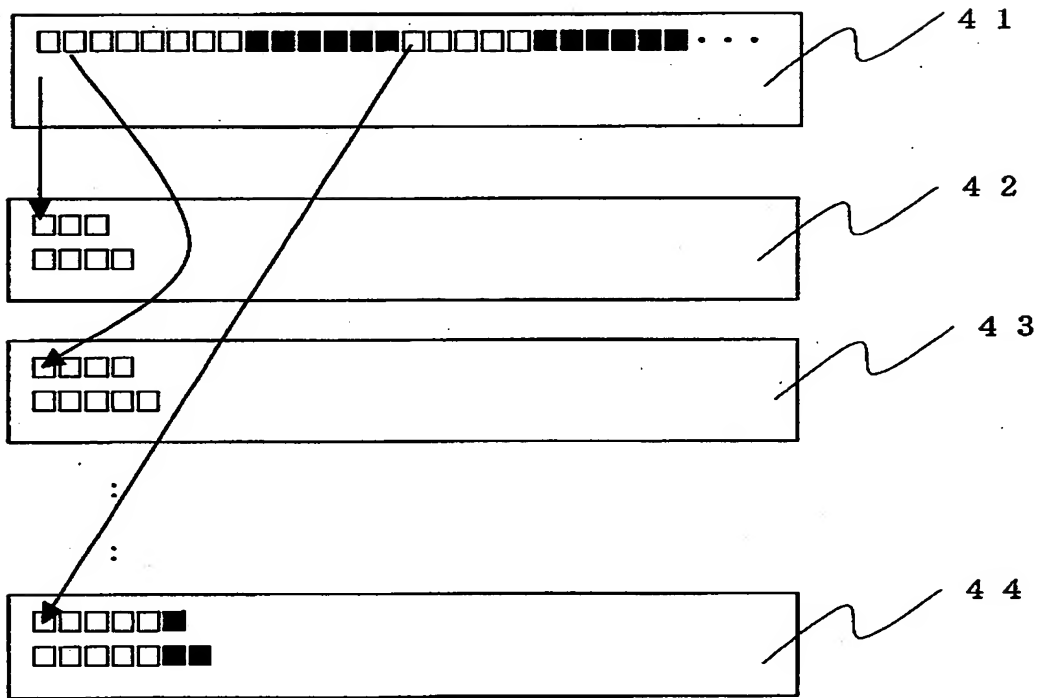
【図 2】



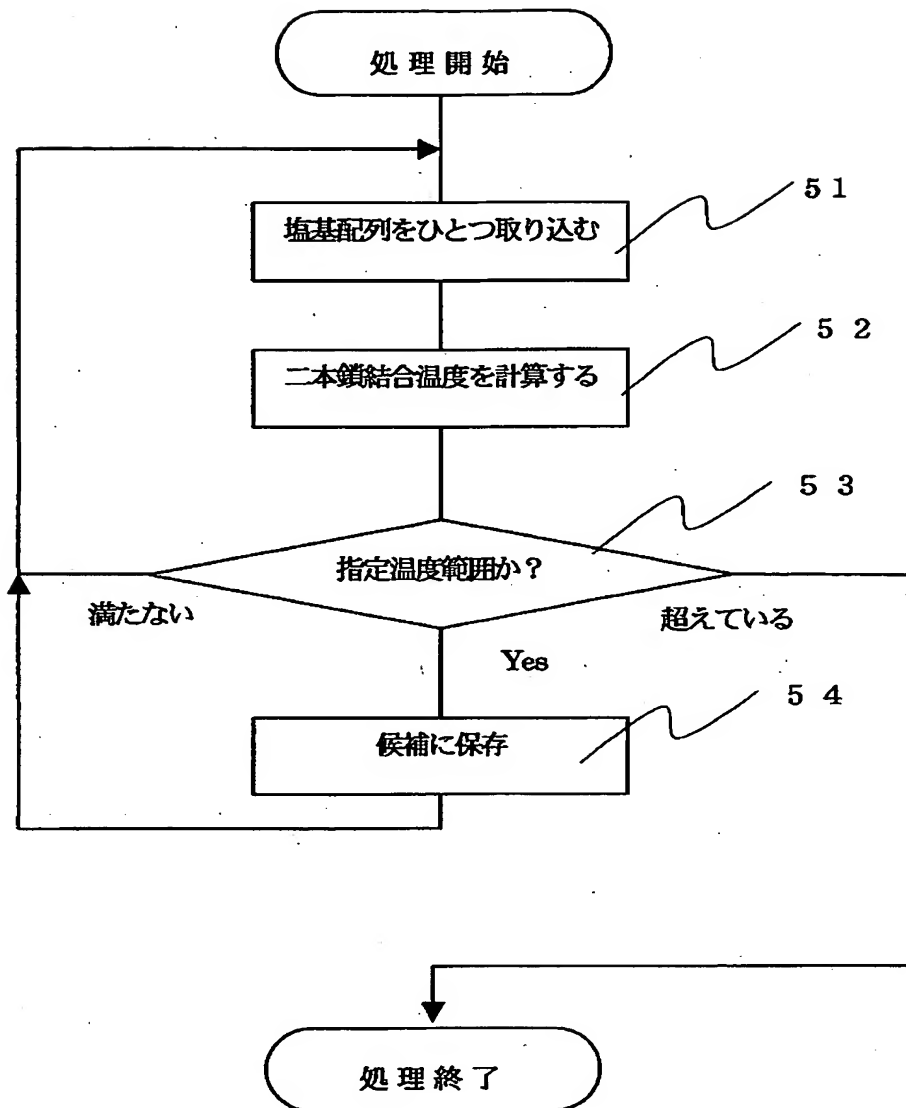
【図 3】



【図 4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オリゴ核酸塩基配列の決定方法を与える。

【解決手段】 互いに独立で所望の温度範囲で二本鎖を形成するようなオリゴ核酸塩基配列を決定するために、対象となる核酸塩基配列を相互比較し、配列の相違が一定条件以上の部分配列を選択する。また、所望の二本鎖形成温度範囲の条件を与え、対象となる核酸塩基配列別に適切な長さで、温度条件を満足する種々の長さのオリゴ核酸塩基配列を算出する手段を与える。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597101155]

1. 変更年月日 1997年10月17日
[変更理由] 新規登録
住 所 千葉県茂原市八千代2-4-11
氏 名 株式会社ダイナコム
2. 変更年月日 2002年 2月 7日
[変更理由] 住所変更
住 所 千葉県茂原市茂原643番地
氏 名 株式会社ダイナコム